

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2016

課題番号：25713008

研究課題名（和文）膜透過性ペプチドの開発とDDSキャリアとしての応用

研究課題名（英文）Development of cell-penetrating peptides and their application as DDS carriers

研究代表者

大庭 誠 (OBA, Makoto)

長崎大学・医歯薬学総合研究科（薬学系）・准教授

研究者番号：20396716

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 18,500,000円

研究成果の概要（和文）：非天然型アミノ酸の一つである、 $\alpha,\alpha$ -ジ置換アミノ酸を利用した膜透過性ペプチドの開発を目的に研究を行なった。 $\alpha,\alpha$ -ジ置換アミノ酸をペプチドに導入することでペプチドは水中においても安定なヘリックス構造を形成した。また、 $\alpha,\alpha$ -ジ置換アミノ酸含有ペプチドは既存の膜透過性ペプチドよりも高い機能を示し、高効率な遺伝子デリバリーにも成功した。

研究成果の概要（英文）：I developed cell-penetrating peptides (CPPs) with  $\alpha,\alpha$ -disubstituted  $\alpha$ -amino acids (dAAs), which are one of the unnatural amino acids. Introduction of dAAs into the peptides stabilized their secondary structures as a helix even in aqueous solution. The dAAs-containing peptides showed high cell-penetrating ability compared to conventional CPPs and delivered plasmid DNA into the cultured cells efficiently.

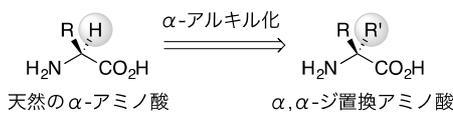
研究分野：創薬化学

キーワード：ペプチド ドラッグデリバリーシステム 非天然型アミノ酸 コンフォメーション

### 1. 研究開始当初の背景

天然の  $\alpha$ -アミノ酸から構成されるオリゴペプチドは、アミノ酸自由度の多さのために安定な二次構造をとることが難しく、創薬研究や生体機能解明のためのツールとして必ずしも良好な結果が得られていない。この問題点を解決するシステムとして、アミノ酸の自由度を制限し、一定のペプチド二次構造をとることができる非天然型アミノ酸に注目が集まっており、 $\beta$ -置換アミノ酸(以下、置換アミノ酸)もその一つである。

(1)置換アミノ酸：置換アミノ酸は図1に示すような特性を有していることから、創薬ツールとして期待されている。申請者はこれまでに、光学活性置換アミノ酸の不斉合成法ならびに新規置換アミノ酸の合成法を開発してきた。



- 1) 化学的安定性の向上
- 2) 親・疎水性のコントロール
- 3) 生体内での加水分解への抵抗性
- 4) 側鎖自由度の制限
- 5) 含有ペプチドの二次構造の自由度の制限

図1.  $\beta$ -置換アミノ酸とその含有ペプチドの特性

(2)置換アミノ酸含有ペプチドの二次構造と機能化： $\beta$ -メチル化ならびに環状置換アミノ酸をペプチドに導入すると安定なヘリックス構造を形成することが明らかになっている。申請者は、置換アミノ酸含有ペプチドの二次構造解析研究に従事し、置換アミノ酸含有ペプチド特有の $3_{10}$ -ヘリックス構造や主鎖が伸びたプラナー構造をとることを見いだした。また、置換アミノ酸の特性を活かした生理活性ペプチドに関する報告も多数行われている。

(3)膜透過性ペプチド：HIV-1 Tat タンパク質やショウジョウバエ Antp タンパク質などに由来するペプチド配列や、アルギニン(Arg)のみからなるオリゴペプチドは、通常は細胞膜を透過できないタンパク質や薬剤などを細胞内に導入することができ、膜透過性ペプチドと呼ばれている。また、ナノ粒子の細胞内輸送も可能であることからドラッグデリバリーシステム(DDS)キャリアとしても期待されているものの、実用化に向けては改善の余地がある。既存の膜透過性ペプチドの大半は10量体以上であり、長鎖のオリゴマーは毒性や取り扱いにくさが問題となる。短鎖でペプチド二次構造の固定化が可能な置換アミノ酸は、これらの点をクリアにする有力なツールになりうる。

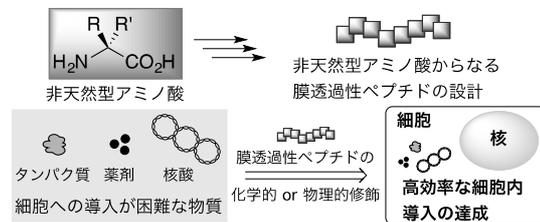
(4)カチオン性高分子を用いた DDS キャリア：申請者は、遺伝子キャリアの開発研究を行う中で、細胞内の特定の環境に反応して膜透過機能を有する新規カチオン性高分子を見いだした。エチレンジアミンを側鎖に有す

るカチオン性高分子が低 pH に反応して膜透過機能を発動させることを明らかにしている。

本研究は、以上の研究背景ならびに申請者がこれまで従事してきた研究から得られた知見・技術より着想するに至った。

### 2. 研究の目的

膜透過性ペプチドを利用し、細胞への導入が困難なタンパク質や薬剤を輸送する研究が盛んに行われ、DDS キャリアとして期待されている。それらの研究は、天然のタンパク質中から発見されたオリゴペプチドを利用したもの、既知のペプチド配列を参考にして天然のアミノ酸を利用したものが大勢を占める。本研究では、既存の膜透過性ペプチドの構造にとらわれず、独自に見いだしたカチオン構造をベースに非天然型アミノ酸を設計し、「膜透過性ペプチドの開発と DDS キャリアとしての応用」を推進する(図2)。



### 3. 研究の方法

申請者がこれまで従事してきた「置換アミノ酸含有ペプチドのコンフォメーション解析」「遺伝子キャリアとして機能するカチオン性高分子の創製」より得られた知見を融合し、(1)新規置換アミノ酸の設計とその含有ペプチドの合成、(2)ペプチド二次構造解析、(3)膜透過性機能の評価、(4)DDS キャリアとしての応用、の4項目により研究を進める。

(1)新規置換アミノ酸の設計とその含有ペプチドの合成：側鎖にエチレンジアミン構造を有する置換アミノ酸を合成し、その含有ペプチドを合成する。

(2)ペプチド二次構造解析：計算化学による構造予測および溶液中・結晶状態での構造解析を行う。ヘリックス、シート、ランダム構造などのペプチド骨格に由来する二次構造だけでなく、pH に反応した側鎖のジアミン構造の変化についても解析を行う。

(3)膜透過性機能の評価：蛍光標識したペプチドを用いて、膜透過性機能の評価を行う。

(4)DDS キャリアとしての応用：膜透過性機能を有することが示唆されたペプチドについて、タンパク質・遺伝子デリバリーが可能であるかを評価する。

### 4. 研究成果

(1)ジ置換アミノ酸を含有するペプチドのコンフォメーション解析

環状アセタールジ置換アミノ酸：水酸基を2つもつ鎖状ジ置換アミノ酸より、種々のアセタール構造を有する環状ジ置換アミノ酸の合成法を開発することに成功した。メントン由来のアセタール構造を有する環状ジ置換アミノ酸を L-ロイシン(L-Leu)シークエンスに導入したペプチドを合成して二次構造解析を行った。FT-IR、NMR、CD測定による溶液中、X線結晶構造解析による結晶状態での構造解析を行ったところ、嵩高い置換基を有していても環状ジ置換アミノ酸はヘリックス構造の安定化に寄与することが明らかになった。また、環状アセタールジ置換アミノ酸を含有するペプチドがヘリックス構造をとる一方で、酸で脱保護してジオールジ置換アミノ酸へと誘導するとランダム構造をとっていた。低 pH に応答してペプチド二次構造を変化させるペプチドを構築することができた(図3)。

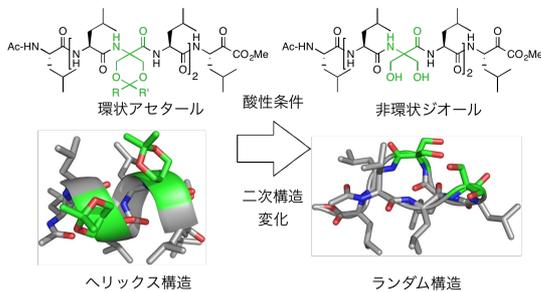


図3. 低 pH に応答したペプチド二次構造変化

アジド基を有する環状ジ置換アミノ酸：側鎖に2つのアジド基を有する五員環状ジ置換アミノ酸の合成に成功した。アジド基はHuisgen反応により種々のアルキンと反応し、様々な置換基・官能基を導入することができた。この反応はアミノ酸のみならずヘキサホモペプチドにおいても可能であった(図4)。またL-Leuやアキラルなジ置換アミノ酸から構成されるペプチドに導入して二次構造解析を行いHuisgen反応の前後でコンフォメーションが変化することが明らかになった。

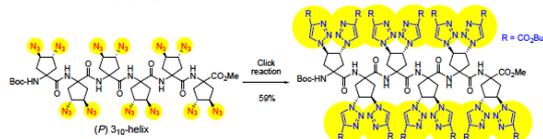


図4. アジド基を有する環状ジ置換アミノ酸含有ペプチドとHuisgen反応による側鎖構造変換

環状・鎖状ジ置換アミノ酸含有ペプチド：プロピル基を2つもつ鎖状ジ置換アミノ酸Dpgと、七員環状ジ置換アミノ酸Ac<sub>7</sub>CをL-Leuシークエンス中に導入したオクタペプチドを合成しペプチド二次構造解析を行った。両ペプチドともに、溶液中・結晶状態において同じような右巻きの<sub>3</sub><sub>10</sub>-ヘリックス構造を形

成していた。DpgとAc<sub>7</sub>Cの側鎖構造の違いでは、L-Leuペプチドの二次構造に与える影響が小さいことが明らかになった。

(2)膜透過性ペプチドの開発と遺伝子デリバリー

L-Arg/D-Argペプチド：Argのもつ膜透過性機能と、最も簡単な構造のジ置換アミノ酸Aibのもつヘリックス形成能を兼ね備えたペプチドを設計し、その二次構造解析ならびに膜透過機能を評価した。L-ArgとD-Argを組み合わせて数種類のペプチドを合成した。安定なヘリックス構造を形成し、Argを一方に配置させたペプチドが最も高い膜透過性を示した。

五員環状ジ置換アミノ酸含有ペプチド：五員環状ジ置換アミノ酸Ac<sub>5</sub>Cのヘリックス形成能を利用した膜透過性ペプチドを設計した。具体的には、L-Argを3残基、L-LeuとAc<sub>5</sub>Cを合計で6残基含む7種類のノナペプチドを合成した。CDスペクトル測定により、Ac<sub>5</sub>Cの含有量により二次構造が変化することが明らかになった。膜透過性機能の評価では、Ac<sub>5</sub>Cを3残基含むペプチドが最も細胞に取り込まれていた(図5)。この理由として、Ac<sub>5</sub>Cを導入することによるペプチド血清プロテアーゼに対する加水分解耐性の獲得と、水溶液中における<sub>3</sub><sub>10</sub>-ヘリックス構造形成の相乗効果によることが示唆された。

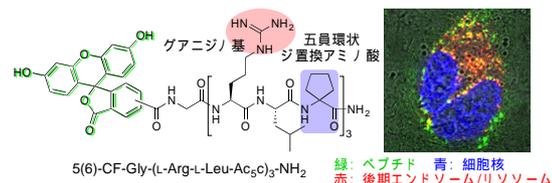


図5. 五員環状ジ置換アミノ酸含有膜透過性ペプチド

Aib含有ペプチド:L-ArgのみからなるノナペプチドR9、L-Arg6残基とグリシン3残基からなるノナペプチド(RRG)3、L-Arg6残基とAib3残基からなるノナペプチド(RRU)3を合成し、膜透過性機能ならびにプラスミドDNA(pDNA)デリバリーについて検討した。膜透過性機能、pDNAデリバリー効率ともにR9が最も優れていた。(RRU)3については、ヘリックス構造に固定化することで(RRG)3と比べると高い膜透過機能を有していたが、pDNAデリバリー効率はR9と比べると著しく低下していた。

エチレンジアミン構造を基盤とするペプチド(図6)：側鎖にグアニジニルエチル(GEt)アミン構造を有するL-Lysを合成し、そのペプチドの膜透過性機能ならびにpDNAデリバリーについて評価した。膜透過性機能はR9と比べると低濃度で有意に高かった。pDNAデリバリー効率はR9と比べると100倍以上高く、市販の遺伝子導入試薬と比べても遜色なかった。また、市販の遺伝子導入試薬が細胞毒性を惹起する一方で、Lys(GEt)ペプチド

にはそのような毒性は見られなかった。

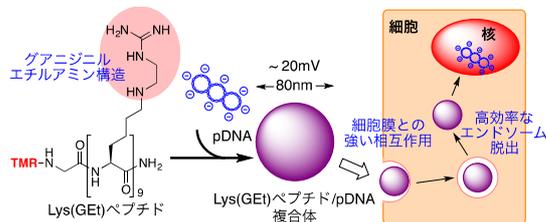


図 6 . Lys(GE)ペプチドによる pDNA デリバリー

ピペリジン骨格を有するジ置換アミノ酸含有ペプチド：側鎖がピペリジンである環状ジ置換アミノ酸ならびにその誘導体を合成し、ジ置換アミノ酸含有ペプチドの膜透過性機能を評価した。R9 と比べて持続性のある高い膜透過性を示した。

(3)タンパク質デリバリー：in vitro と in vivo の長所を兼ね備えたがんスフェロイドを用いたタンパク質デリバリーの評価を行った。共焦点顕微鏡を用いた評価により、デリバリーシステムによって組織浸透性が異なることが明らかになった。本評価方法は、膜透過性ペプチドを評価する上でも非常に有用である。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 13 件)

1. H. Yamashita, T. Misawa, M. Oba, M. Tanaka, M. Naito, M. Kurihara\*, Y. Demizu\*, Development of helix-stabilized cell-penetrating peptides containing cationic  $\alpha, \alpha$ -disubstituted amino acids as helical promoters. *Bioorg. Med. Chem.*, 25, 1846-1851 (2017). 査読有  
DOI: 10.1016/j.bmc.2017.01.044
2. T. Kato, H. Yamashita, T. Misawa, K. Nishida, M. Kurihara, M. Tanaka, Y. Demizu\*, M. Oba\*, Plasmid DNA delivery by arginine-rich cell-penetrating peptides containing unnatural amino acids. *Bioorg. Med. Chem.*, 24, 2681-2687 (2016). 査読有  
DOI: 10.1016/j.bmc.2016.04.031
3. K. Furukawa, M. Oba\*, G. O. Opiyo, M. Doi, M. Tanaka\*, Cyclic  $\alpha, \alpha$ -disubstituted  $\alpha$ -amino acids with menthone in their side chains through an acetal moiety and helical structures of their peptides. *Eur. J. Org. Chem.*, 16, 2988-2998 (2016). 査読有  
DOI: 10.1002/ejoc.201600241
4. M. Oba\*, H. Nonaka, M. Doi, M. Tanaka\*, Conformational studies on peptides having dipropylglycine (Dpg) or 1-aminocycloheptanecarboxylic acid (Ac<sub>7</sub>c) within the sequence of L-leucine (Leu) residues. *Biopolymers (Pept. Sci.)*, 106, 210-218 (2016). 査読有  
DOI: 10.1002/bip.22810
5. M. Oba\*, T. Kato, K. Furukawa, M. Tanaka, A cell-penetrating peptide with a guanidylethyl amine structure directed to gene delivery. *Sci. Rep.*, 6, 19913 (2016). 査読有  
DOI: 10.1038/srep19913
6. H. Yamashita, M. Oba, T. Misawa, M. Tanaka, T. Hattori, M. Naito, M. Kurihara\*, Y. Demizu\*, A helix-stabilized cell-penetrating peptide as an intracellular delivery tool. *ChemBioChem*, 17, 137-140 (2016) 査読有  
DOI: 10.1002/cbic.201500468
7. M. Oba\*, Y. Demizu, H. Yamashita, M. Kurihara, M. Tanaka, Plasmid DNA delivery using fluorescein-labeled arginine-rich peptides. *Bioorg. Med. Chem.*, 23, 4911-4918 (2015). 査読有  
DOI: 10.1016/j.bmc.2015.05.025
8. M. Oba\*, N. Kawabe, H. Takazaki, Y. Demizu, M. Doi, M. Kurihara, H. Suemune, M. Tanaka\*, Conformational studies on peptides having chiral five-membered ring amino acid with two azido or triazole functional groups within the sequence of Aib residues. *Tetrahedron*, 70, 8900-8907 (2014). 査読有  
DOI: 10.1016/j.tet.2014.09.086
9. T. Kato, M. Oba\*, K. Nishida, M. Tanaka, Cell-penetrating helical peptides having L-arginines and five-membered ring  $\alpha, \alpha$ -disubstituted  $\alpha$ -amino acids. *Bioconjugate Chem.*, 25, 1761-1768 (2014). 査読有  
DOI: 10.1021/bc5003949
10. M. Oba, H. Takazaki, N. Kawabe, M. Doi, Y. Demizu, M. Kurihara, H. Kawakubo, M. Nagano, H. Suemune, M. Tanaka\*, Helical peptide-foldamers having a chiral five-membered ring amino acid with two azido functional groups. *J. Org. Chem.*, 79, 9125-9140 (2014). 査読有  
DOI: 10.1021/jo501493x
11. H. Yamashita, Y. Demizu\*, T. Shoda, Y. Sato, M. Oba, M. Tanaka, M. Kurihara\*, Amphipathic short helix-stabilized peptides with cell-membrane penetrating ability. *Bioorg. Med. Chem.*, 22, 2403-2408 (2014). 査読有  
DOI: 10.1016/j.bmc.2014.03.005
12. T. Kato, M. Tanaka, M. Oba\*, Protein transfection study using multicellular spheroids of human

hepatoma Huh-7 cells. PLoS ONE, 8, e82876 (2013). 査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0082876

13. M. Oba\*, N. Ishikawa, Y. Demizu, M. Kurihara, H. Suemune, M. Tanaka\*, Helical oligomer with changeable chiral acetal moiety. Eur. J. Org. Chem., 34, 7679-7682 (2013). 査読有  
DOI: 10.1002/ejoc.201301450

〔学会発表〕(計 14 件)

1. M. Oba, T. Kato, M. Tanaka, Cell-penetrating peptide foldamers containing  $\alpha,\alpha$ -disubstituted  $\alpha$ -amino acids directed to plasmid DNA delivery, Symposium on Foldamers 2016, (Bordeaux, France), 2016 年 9 月 26 日～28 日.
2. M. Oba, K. Furukawa, T. Kato, M. Tanaka, Gene delivery using a cell-penetrating peptide with a guanidylethyl amine structure, The 8th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences, Biomolecule-Based Medicinal Science: Featuring Mid-Size Drugs, 武田薬品研修所(大阪府・大阪市), 2016 年 1 月 21 日～22 日.
3. M. Oba, H. Nounaka, K. Furukawa, K. Toyama, M. Tanaka, Environmentally-responsive cyclic  $\alpha,\alpha$ -disubstituted  $\alpha$ -amino acids for controlling peptide secondary structures, Pacificchem 2015 (Honolulu, Hawaii, USA), 2015 年 15 日～20 日.
4. M. Oba, K. Furukawa, T. Kato, Y. Demizu, H. Yamashita, M. Kurihara, M. Tanaka, Cell-penetrating ability and plasmid DNA delivery using fluorescein-labeled arginine-rich peptides, 11th Australian Peptide Conference (Kingscliff, Australia), 2015 年 10 月 25 日～30 日.
5. 大庭 誠, ドラッグデリバリーペプチドの開発, BioJapan 2015, パシフィック横浜(神奈川県・横浜市), 2015 年 10 月 14 日～15 日.
6. 大庭 誠, 古川かほり, 加藤巧馬, 山下博子, 出水庸介, 栗原正明, 田中正一, アルギニン含有ペプチドの細胞膜透過性と pDNA デリバリーに関する研究, 第 31 回日本 DDS 学会学術集会, 慶應大学(東京都・港区), 2015 年 7 月 2 日～3 日.
7. 大庭 誠, 古川かほり, 加藤巧馬, 田中正一, グアニジニルエチルアミン構造を側鎖に有する非天然型アミノ酸を利用した膜透過性ペプチドの開発, 日本ケミカルバイオロジー学会第 10 回年会, 東北大学(宮城県・仙台市), 2015

年 6 月 10 日～12 日.

8. 大庭 誠, 加藤巧馬, 田中正一, 五員環状アミノ酸を含有する膜透過性ヘリカルペプチドの開発, 第 32 回メディシナルケミストリーシンポジウム, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市), 2014 年 11 月 26 日～28 日.
9. M. Oba, A. Shimabukuro, M. Ono, M. Doi, M. Tanaka, Synthesis of both enantiomers of cyclic methionine analogue and its derivative, 33rd European Peptide Symposium (Sofia, Bulgaria), 2014 年 8 月 31 日～9 月 5 日.
10. 大庭 誠, 遠山琴美, G. O. Opiyo, 田中正一, 側鎖にアセタールを有する環状ジ置換アミノ酸とその含有ペプチドの合成, 日本ケミカルバイオロジー学会第 9 回年会, 大阪大学(大阪府・大阪市), 2014 年 6 月 11 日～13 日.
11. 大庭 誠, 非天然型アミノ酸を利用した機能性ペプチドの開発, 第 14 回次世代医工学研究会, 沖縄県市町村自治会館(沖縄県・那覇市), 2014 年 1 月 28 日～30 日.
12. M. Oba, I. Kato, Y. Demizu, M. Kurihara, M. Doi, Y. Takano, H. Suemune, M. Tanaka, Synthesis of cyclic  $\alpha,\alpha$ -disubstituted amino acids bearing a pendent chiral center and conformational analysis of heteropeptides containing their amino acids, 10th Australian Peptide Conference (Penang, Malaysia), 2013 年 9 月 8 日～13 日.
13. 大庭 誠, 加藤巧馬, 田中正一, 細胞膜透過性ヘリカルペプチドの開発, 第 29 回日本 DDS 学会学術集会, 京都テルサ(京都府・京都市), 2013 年 7 月 4 日～5 日.
14. M. Oba, I. Kato, Y. Demizu, M. Kurihara, M. Doi, Y. Takano, H. Suemune, M. Tanaka, Synthesis of cyclic  $\alpha$ -amino acids bearing a pendent chiral center and conformational studies on peptides containing their amino acids in Aib sequence, The 23rd FRENCH-JAPANESE SYMPOSIUM on Medicinal and Fine Chemistry, (長崎県・長崎市), 2013 年 5 月 12 日～15 日.

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 新規膜透過性ペプチド  
発明者: 大庭 誠, 田中正一  
権利者: 長崎大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2015-7230  
出願年月日: 2015 年 3 月 31 日

国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://research.jimu.nagasaki-u.ac.jp/IST?ISTActId=FINJPDetaiI&ISTKidoKbn=&ISTErrorChkKbn=&ISTFormSetKbn=&ISTTokenChkKbn=&userId=100000568>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

大庭 誠 (OBA, Makoto)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・

准教授

研究者番号：20396716